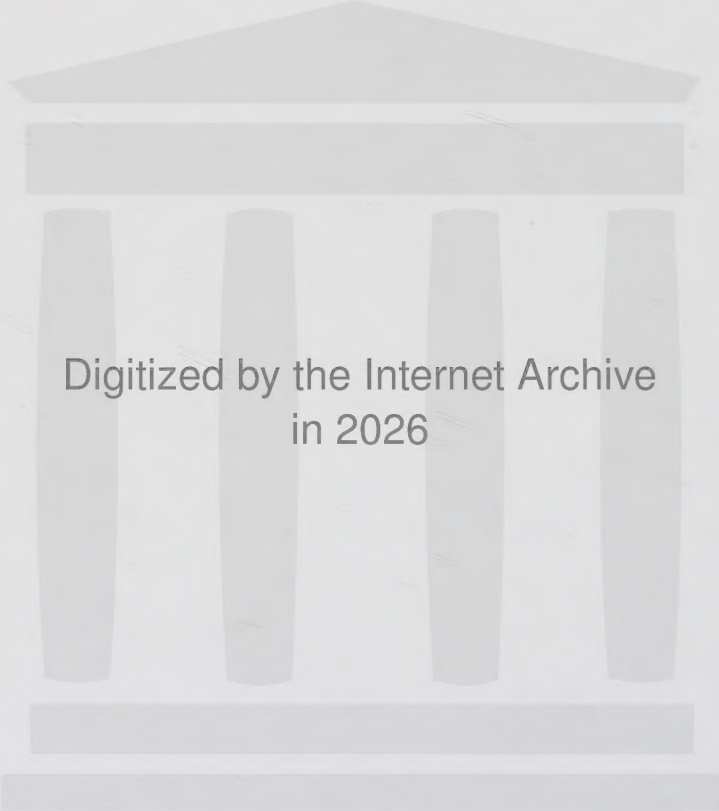


**UNTERSUCHUNGEN ZUR VERDRÄNGUNG VON
ARZNEISTOFFEN AUS DER
PLASMA-PROTEINBINDUNG DURCH BILIRUBIN**

Hubert Kern

1977



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41555604_0002

Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität München

Direktor: Prof. Dr. M. Kiese

UNTERSUCHUNGEN ZUR VERDRÄNGUNG VON ARZNEISTOFFEN AUS
DER PLASMA-PROTEINBINDUNG DURCH BILIRUBIN

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
an der Ludwig Maximilians-Universität zu München



vorgelegt von

Hubert Kern

aus

München

Jahr

1977

Mit Genehmigung des Fachbereichs Medizin der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. H. Kurz
Mitberichterstatter: Prof. Dr. M. Kiese
Dekan: Prof. Dr. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 1.12. 1977



Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
2. Methodik	3
2.1 Gewinnung des Plasmas	3
2.2 Gleichgewichtsdialyse	3
2.3 Substanzen und Bestimmungsmethoden	7
3. Gesamtergebnisse	9
4. Ergebnisse im Einzelnen	11
4.1 Sulfamethoxydiazin	11
4.2 Thiopental	15
4.3 Meticillin	17
4.4 Nitrofurantoin	20
4.5 Salicylsäure	21
4.6 Desipramin	22
5. Diskussion	23
6. Zusammenfassung	31
7. Literaturverzeichnis	32

1. Einleitung

Bei Früh- und Neugeborenen ist die Gefahr eines Kernikterus erhöht, wenn mit bestimmten Arzneimitteln behandelt wird.

Diese Tatsache ergab sich aus klinischen Experimenten und aus Beobachtungen unerwünschter Wirkungen von Arzneimitteln bei Säuglingen (Harris et al. 1958).

Bei einer Serumbilirubinkonzentration von 20 mg% ist mit der Gefahr eines Kernikterus zu rechnen. Bei Frühgeborenen liegt die kritische Grenze tiefer, da Anoxie und respiratorische Azidose die Gefahr der Bilirubin-Encephalopathie erhöhen (Stern und Denton 1965).

Die Gefahr des Kernikterus läßt sich nicht aus der Gesamtbilirubinkonzentration abschätzen, sondern ist abhängig vom Einfluß von Substanzen wie Hämatin, Sulfonamide, Salicylat, Coffein-Natriumbenzoat und auch von der H^+ -Ionen Konzentration (Odell 1959).

Silvermann et al. (1956) berichten von einem Anstieg an Kernikteruserkrankungen bei der Behandlung Frühgeborener mit einem Gemisch aus Penicillin-Sulfisoxazol im Vergleich zu Oxytetracyclin.

Untersuchungen von Diamond (1969) ergaben keine Hinweise auf Unterschiede in der Qualität der Blut-Hirnschranke Neugeborener und Erwachsener. Es besteht keine "Unreife" der Blut-Hirnschranke bei Neugeborenen, sondern Kernikterus sei allein abhängig von der Höhe ungebundenen Bilirubins.

Gründe des Bilirubinanstieges liegen in einer verminderten Glukuronyltransferaseaktivität in der Leber-

zelle und einer reduzierten Glomerulumfiltration und Tubulusfunktion.

Yaffe (1966) beobachtete im Tierversuch bei Neugeborenen eine 2-3 fach erhöhte Glucuronyltransferaseaktivität nach der Vorbehandlung mit Barbiturat.

Mirkin (1970) und Mowat (1968) fanden eine direkte Beziehung zwischen der Ausscheidung von D-glucaric Säure (D-Zuckersäure) und der Glucuronyltransferaseaktivität.

Unterschiede zwischen der Proteinbindung Neugeborener und Erwachsener fanden Ganshorn und Kurz (1968).

Im Neugeborenenplasma liegt eine geringere Proteinbindung vor im Vergleich zum Erwachsenenplasma. Daraus resultiert bei Neugeborenen eine höhere freie Konzentration der Arzneimittel.

Behrmann und Battaglia (1967), Chignell et al. (1971), Ehrnebo et al. (1971), Mather et al. (1971), Pruitt und Dayton (1971) bestätigten in der Zwischenzeit diese Ergebnisse.

Die geringere Gesamtproteinkonzentration kommt als Ursache der verminderten Proteinbindung nicht in Frage, wie weitere Untersuchungen bestätigten (Kurz et al. 1976).

Ein bedeutender Unterschied im Plasma von Neugeborenen und Erwachsenen liegt in der Konzentration des unkonjugierten Bilirubins. Es lag deshalb nahe, den Einfluß dieser unterschiedlichen Bilirubinkonzentration auf die Plasma-Proteinbindung nachzuprüfen.

Dies war die Aufgabe meiner Arbeit:

Kann Bilirubin Arzneimittel aus der Plasma-Proteinbindung verdrängen, und inwiefern läßt sich damit die höhere freie Konzentration beim Neugeborenen erklären.

2. Methodik

2.1 Gewinnung des Plasmas

Blutplasma wurde gesunden Spendern entnommen, die bis zu 48 Stunden vor der Blutentnahme keinerlei Arzneimittel eingenommen hatten.

Der Zusatz von 2 ml Natriumcitratlösung 33% pro 100 ml Blutplasma verhinderte die Blutgerinnung. Die Zentrifugation erfolgte nach halbstündigem Stehen im Kühlschrank. Das so gewonnene Plasma wurde mit 0,5 m KH_2PO_4 und Na_2HPO_4 auf pH 7,4 eingestellt und mit 1/15 m Phosphatpuffer versetzt, so daß die Gesamtmenge der Phosphatlösungen im Plasma 10% ausmachte. Bis unmittelbar vor dem Versuchsansatz lagerte das Plasma bei -32°C .

Baur et al. (1977) zeigten, daß die Bindungseigenschaften des Plasmas durch Lagerung bei -32°C nicht beeinträchtigt werden. Der pH-Wert war nach dem Auftauen teilweise zur alkalischen Seite hin verschoben und mußte mit wenigen Tropfen 0,1 n HCl erneut auf pH 7,4 eingestellt werden.

2.2 Gleichgewichtsdialyse

Zur Bestimmung der Proteinbindung wurde die Methode der Gleichgewichtsdialyse verwandt (Kurz et al. 1977).

Semipermeable Cellulose-Schläuche der Firma Visking mit einem Durchmesser von 7 mm und einer mittleren Porenweite von 2,4 nm wurden jeweils mit 1/15 m Phosphatpuffer, Plasma und Plasma + Bilirubinzusatz gefüllt.

Diese Schläuche tauchten in einer Lösung aus 1/15 m Phosphatpuffer, in der das jeweilige Arzneimittel gelöst war.

Bei der Bestimmung der Proteinbindung von Salicylsäure wurde ausnahmsweise Trispuffer pH 7,4 verwendet. Unter ständigem Hin- und Herbewegen der Schläuche konnte über Nacht die Dialyse erfolgen.

Innerhalb des Schlauches wird ein Teil des Arzneimittels an die Plasmaproteine gebunden. Im Gleichgewicht entspricht die Konzentration des freien Anteils des Arzneimittels innerhalb des Schlauches der Konzentration in der Außenflüssigkeit. Durch Messung der Konzentration in der Außenflüssigkeit kann indirekt die Proteinbindung, d.h. die Konzentration des gebundenen Anteils bestimmt werden.

2.2.1 Versuchsansätze zur Untersuchung des Einflusses von Bilirubin auf die Bindung von Pharmaka

Dialyse- schlauch	Außenflüssigkeit	Konzentr. Testsubst.	gemessene Extinktion
Puffer	Puffer ohne Subst.	—	E'_0
Plasma	Puffer ohne Subst.	—	E_0
Plasma + Bilir.	Puffer ohne Subst.	—	E''_0
Plasma	Puffer mit Subst.	C_1	E_1
Puffer	Puffer mit Subst.	C_2	E_2
Plasma + Bilir.	Puffer mit Subst.	C_3	E_3

E'_0	Blindwert Puffer/Puffer
E_0	Blindwert Plasma/Puffer
E''_0	Blindwert Plasma + Bilir./Puffer
E_1	Konzentration des freien Anteils
E_2	Konzentration der Gesamtmenge ohne Plasma
E_3	Konzentration des freien Anteils

2.2.2 Berechnung der Proteinbindung:

C_1	=	Konzentration des freien Anteils
D	=	Volumen der Außenflüssigkeit
S	=	Füllvolumen des Dialysierschlauches
C_2	=	Konzentration der Außenflüssigkeit des mit Puffer gefüllten Schlauches

Gesamtmenge im Dialysiersystem $(D + S) * C_2$

Gesamtmenge im Plasma $(D + S) * C_2 - D * C_1$
(Protein gebunden + freier Anteil)

Gesamtkonzentration im Plasma $\frac{(D + S) * C_2 - D * C_1}{S}$

Konzentration des gebundenen
Anteils $\frac{(D + S) * C_2 - D * C_1}{S} - C_1$

Freier Anteil A in Prozent der Gesamtkonzentration:

$$A = 100\% * \frac{S * C_1}{(D + S) * C_2 - D * C_1}$$

Die Konzentrationen ergeben sich aus den Extinktionen minus den entsprechenden Blindwerten.

$$A = 100\% * \frac{5 * (E_1 - E_0)}{12 * (E_2 - E'_0) - 7 * (E_1 - E_0)}$$

Der gebundene Anteil beträgt:

$$B = 100\% - A$$

Eine mögliche Adsorption der Substanzen an die Dialysierschläuche, beziehungsweise eine Verfälschung durch Stoffe, die aus dem Plasma dialysiert wurden, wird durch die jeweiligen Blindwerte korrigiert.

Die Formel ergibt keine absoluten Bindungswerte, sondern zeigt das Verhältnis des freien zum gebundenen Anteil auf.

2.3 Substanzen und Bestimmungsmethoden

a) Sulfamethoxydiazin

Bestimmung nach der Methode von Bratton und Marshall (1939). Nachweis der aromatischen Aminogruppe durch Bildung einer Schiff'schen Base und Kopplung mit β -Naphthol zur farbigen Azoverbindung.

Messung der Extinktion nach Zugabe von HCl konz. bei 540 nm.

b) Meticillin

Bestimmung nach der Methode von Weaver und Reschke (1963). Das gut wasserlösliche Meticillin wurde mit Acetatpuffer und Kupfersulfatlösung auf den pH-Wert von 3,7 gebracht.

Messung der Extinktion bei 330 nm.

c) Nitrofurantoin

Bestimmung nach der Methode von Kurz (1964).

Messung der Extinktion nach Zugabe von 0,05 n Boraxlösung bei 388 nm.

d) Thiopental

Bestimmung nach der Methode von Brodie et al. (1950).

Messung der Extinktion bei 305 nm.

e) Salicylsäure

Die Probe wurde mit 0,3 ml Eisenreagenz ($1,2 \text{ g Fe(NO}_3)_3$) in 10 ml 1 nHNO_3 versetzt.

Die Extinktion wurde bei 540 nm gemessen.

Zum Lösen des Arzneimittels konnte in der Außenflüssigkeit $1/15 \text{ m}$ Phosphatpuffer nicht verwendet werden, da Phosphat mit Eisenreagenz einen Eisenphosphatniederschlag bildet. Aus diesem Grunde wurde ausnahmsweise mit Tris-puffer pH 7,4 gearbeitet.

f) Desipramin

Die Probe wird nach dem Alkalisieren mit Petroläther (dest. ohne Amylalkohol) extrahiert, in $0,1 \text{ n HCl}$ re-extrahiert.

Messung der Extinktion bei 250 nm.

3. Gesamtergebnisse

Tab. 1

Übersicht der Gesamtergebnisse. Plasmaproteinbindung aller untersuchten Substanzen ohne und mit Bilirubin-zusatz. $\bar{x}$ = Mittelwert der Plasmaproteinbindung aller Einzelergebnisse (n=12). $s_{\bar{x}}$ = Streuung des Mittelwertes.

Substanz	P l a s m a p r o t e i n b i n d u n g				
	ohne Bilir.	mit Bilir. 2 mg%	mit Bilir. 4 mg%	mit Bilir. 10 mg%	mit Bilir. 20 mg%
Sulfamethoxydiazin	$\bar{x}$ 94,0 $s_{\bar{x}} \pm 0,2$	94,0 $\pm 0,3$	93,1 $\pm 0,2$	91,5 $\pm 0,3$	87,3 $\pm 0,2$
Thiopental	$\bar{x}$ 85,1 $s_{\bar{x}} \pm 0,4$		85,4 $\pm 0,5$	84,2 $\pm 0,3$	82,4 $\pm 0,4$
Meticillin	$\bar{x}$ 60,1 $s_{\bar{x}} \pm 1,8$	52,2 $\pm 1,6$	54,6 $\pm 1,8$	50,6 $\pm 1,4$	42,6 $\pm 2,1$
Nitrofurantoin	$\bar{x}$ 63,0 $s_{\bar{x}} \pm 1,9$	63,2 $\pm 1,4$	62,5 $\pm 1,5$	62,0 $\pm 1,4$	61,2 $\pm 2,4$
Natrium-salicylat	$\bar{x}$ 96,5 $s_{\bar{x}} \pm 0,7$				96,6 $\pm 0,5$
Desipramin	$\bar{x}$ 76,7 $s_{\bar{x}} \pm 1,6$				79,9 $\pm 1,6$

Die Zugabe von Bilirubin in einer Endkonzentration von 20 mg% ergab eine Verdrängung bei Sulfamethoxydiazin, Meticillin und Thiopental.

Bei Nitrofurantoin, Salicylsäure und Desipramin konnten bei 20 mg% Bilirubinzusatz keine statistisch gesicherten Veränderungen nachgewiesen werden.

4. Ergebnisse im Einzelnen

4.1 Sulfamethoxydiazin

Tab. 2

Plasmaproteinbindung für Sulfamethoxydiazin ohne und mit Bilirubin in verschiedenen Konzentrationen.
t-Test für gepaarte Werte.

P l a s m a p r o t e i n b i n d u n g

ohne Bilir.	mit Bilir. 2 mg%	mit Bilir. 4 mg%	mit Bilir. 10 mg%	mit Bilir. 20 mg%
$\bar{x}$ 94,0	94,0	93,1	91,5	87,3
$s_{\bar{x}}$ $\pm 0,2$	$\pm 0,3$	$\pm 0,2$	$\pm 0,3$	$\pm 0,2$
n	4	4	4	4
d	0,06	0,92	2,52	6,78
s_d^2	0,54	1,13	0,5	0,57
t	0,22	14,25	9,07	23,56
p	n.s.	$< 0,001$	$< 0,01$	$< 0,001$

Die Werte ohne Bilirubinzusatz werden verglichen mit den Werten, die mit Bilirubinzusatz gemessen wurden.

$\bar{x}$ = Mittelwert der Proteinbindung aller Einzelergebnisse,
 $s_{\bar{x}}$ = Standardfehler des Mittels, n = Anzahl der eingegebenen Wertpaare, d = Mittelwert der Differenzen der eingegebenen Wertpaare, s_d^2 = Varianz der Differenzen,
 t = Testgröße, mit deren Hilfe das "p" in der Tabelle nachgesehen werden kann, p = Irrtumswahrscheinlichkeit.

Der t-Test für gepaarte Werte erlaubt Bindungswerte zu vergleichen, die unter denselben Bedingungen und zur gleichen Zeit entstanden sind.

$\bar{x}$ ist der Mittelwert aus 12 Bindungswerten. Ein Bindungswert entsteht aus 3 quantitativen Bestimmungen, die pro Ansatz erfolgen.

Jeweils 3 Werte sind zur gleichen Zeit unter denselben Bedingungen entstanden. Das ergibt 4 Gruppen ($n = 4$) mit jeweils 3 Bindungswerten.

Bei 20 mg% Bilirubin ist die Verdrängung mit einer hohen Signifikanz von $p \leq 0,001$ nachgewiesen.

Bei 4 mg% Bilirubin ergibt sich eine höhere Signifikanz ($p \leq 0,001$) als bei 10 mg% ($p \leq 0,01$), obwohl die Differenz zur Probe ohne Bilirubin bei 10 mg% jeweils größer ist als bei 4 mg%. Berücksichtigt sind dabei die größeren Schwankungen in der Differenz der Mittelwerte zwischen den einzelnen Reihen.

Deshalb ergibt die 10 mg% Reihe eine geringere Signifikanz, obwohl sich die freie Konzentration im Mittel von 6% auf 8,5% erhöht; in der 4 mg% Reihe aber nur von 6% auf 6,9%.

Bei 2 mg% Bilirubin keine Verdrängung.

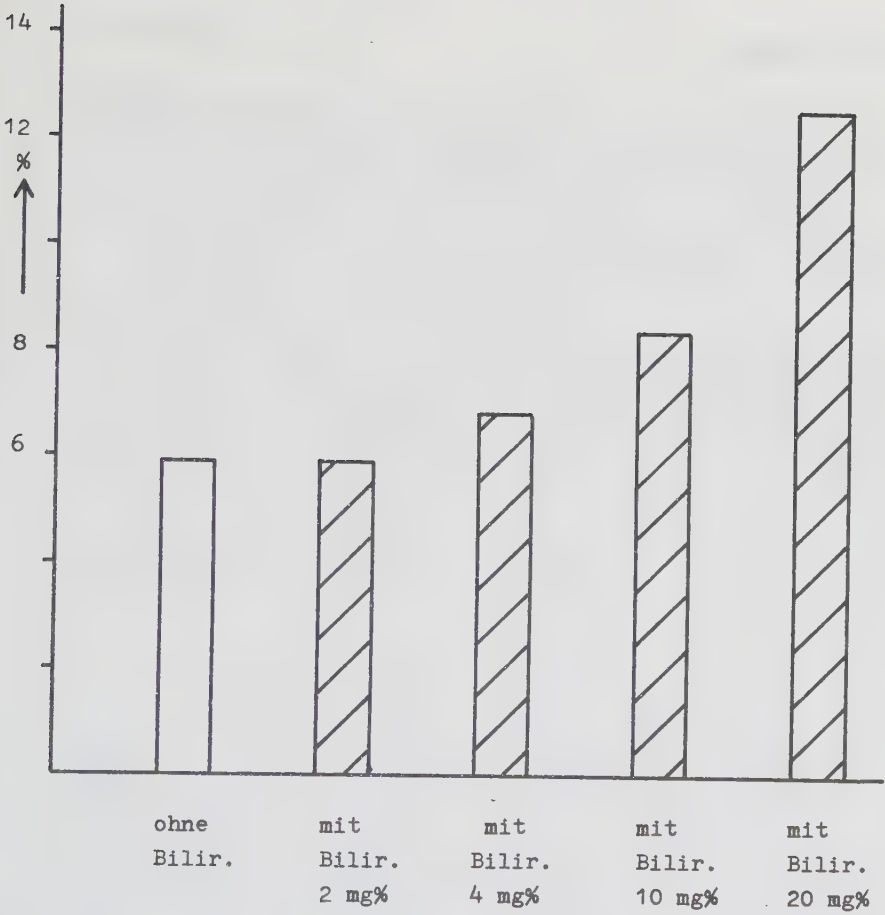


Abb. 1

Freie Konzentration von Sulfamethoxydiazin in Abhängigkeit von der Bilirubinkonzentration.

Text zu Abb. 1

Ohne Bilirubin ergibt sich eine Proteinbindung von 94%, somit eine freie Konzentration von 6%.

Bei 20 mg% Bilirubinzusatz verdoppelt sich die freie Konzentration auf 12,7%.

Auch bei 10 mg% Bilirubin erhöht sich die freie Konzentration auf 8,5%, das entspricht einer Zunahme um 41,5%.

Bei 4 mg% Bilirubin erhöht sich die freie Konzentration auf 6,9%, das entspricht einer Zunahme um 15%.

Bei 2 mg% Bilirubin änderte sich die freie Konzentration nicht.

4.2 Thiopental

Tab. 3

Plasmaproteinbindung für Thiopental ohne und mit Bilirubin in verschiedenen Konzentrationen.

t-Test für gepaarte Werte.

Plasmaproteinbindung

ohne Bilir.	mit Bilir. 4 mg%	mit Bilir. 10 mg%	mit Bilir. 20 mg%
$\bar{x}$ 85,1	85,4	84,2	82,4
$s_{\bar{x}} \pm 0,4$	$\pm 0,5$	$\pm 0,3$	$\pm 0,4$
n	4	4	4
d	- 0,27	0,87	2,65
s_d^2	1,26	0,53	1,32
t	- 0,44	3,29	4,01
p	n.s.	<0,05	<0,05

Die Bilirubinkonzentration von 20 mg% und 10 mg% ergibt eine Verdrängung mit einer Signifikanz von $p < 0,05$. Bei einer Bilirubinkonzentration von 4 mg% keine Verdrängung.

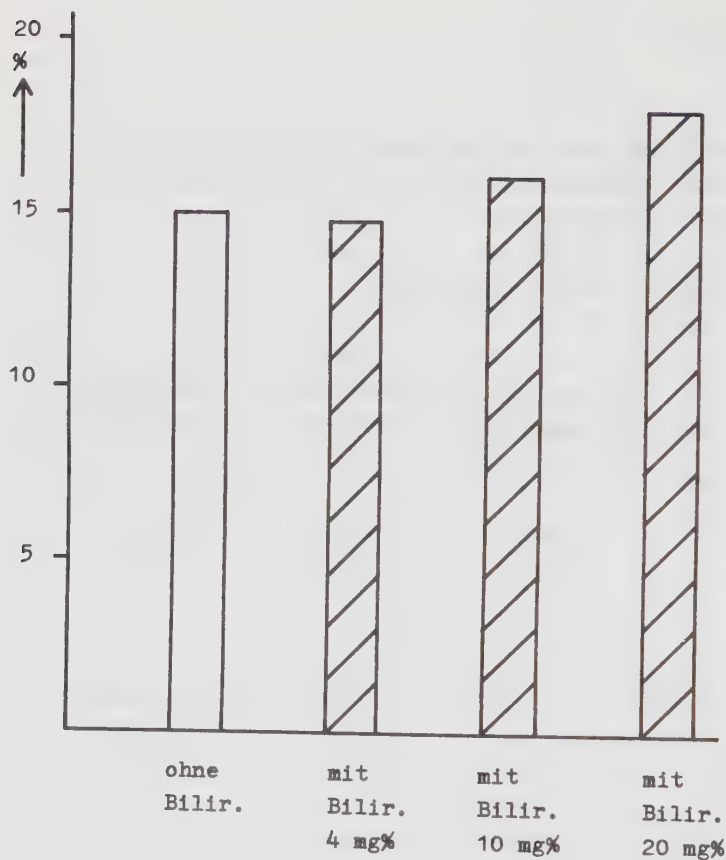


Abb. 2

Freie Konzentration von Thiopental in Abhängigkeit von der Bilirubinkonzentration.

Die Bilirubinkonzentration von 20 mg% ergibt eine Erhöhung der freien Konzentration von 14,9% auf 17,6%; das entspricht einer Zunahme um 17%.

Bei 10 mg% Bilirubin erhöht sich die freie Konzentration auf 15,8%, entsprechend einer Zunahme um 5%.

4.3 Meticillin

Tab. 4

Plasmaproteinbindung für Meticillin ohne und mit Bilirubin in verschiedenen Konzentrationen.

t-Test für gepaarte Werte.

Plasmaproteinbindung

ohne Bilir.	mit Bilir. 2 mg%	mit Bilir. 4 mg%	mit Bilir. 10 mg%	mit Bilir. 20 mg%
$\bar{x}$ 60,1	52,2	54,6	50,6	42,6
$s_{\bar{x}} \pm 1,8$	$\pm 1,6$	$\pm 1,8$	$\pm 1,4$	$\pm 2,1$
n	4	4	4	4
d	17,87	5,52	9,47	17,52
s_d^2	2,57	3,89	3,49	5,08
t	6,12	2,84	5,42	6,89
p	$\leq 0,01$	$\leq 0,1$	$\leq 0,02$	$\leq 0,01$

Die Bilirubinkonzentration von 20 mg% und 2 mg% ergab eine Verdrängung mit einer Signifikanz von $p \leq 0,01$.

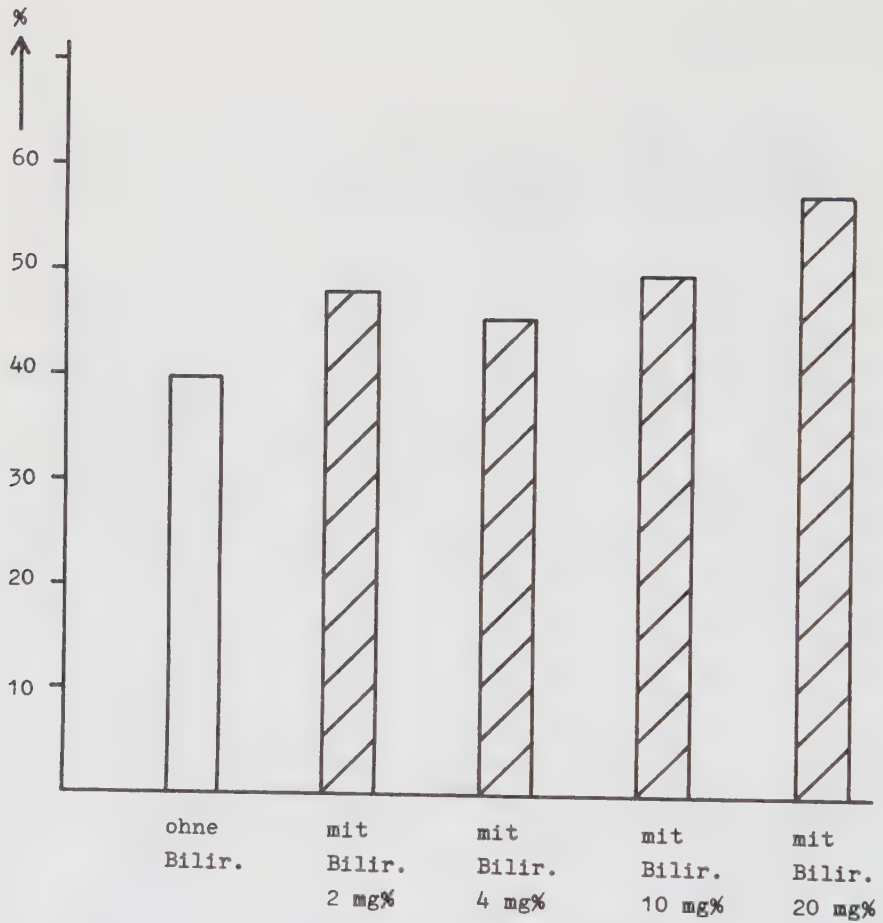


Abb. 3

Freie Konzentration von Meticillin in Abhängigkeit von der Bilirubinkonzentration.

Text zu Abbildung 3

Die Bilirubinkonzentration von 20 mg% ergibt eine Erhöhung der freien Konzentration von 40% auf 57%; das entspricht einer Zunahme um 43,5%.

Bei 10 mg% Bilirubin erhöht sich die freie Konzentration auf 49,4 mg%, entsprechend einer Zunahme um 23,5%.

Bei 4 mg% Bilirubin beträgt die Erhöhung 46,4%, entsprechend einer Zunahme um 16%;

bei 2 mg% Bilirubin 47,8%, entsprechend 19,5% Zunahme.

4.4 Nitrofurantoin

Tab. 5

Plasmaproteinbindung für Nitrofurantoin ohne und mit Bilirubin in verschiedenen Konzentrationen.

t-Test für gepaarte Werte.

P l a s m a p r o t e i n b i n d u n g

ohne Bilir.	mit Bilir. 2 mg%	mit Bilir. 4 mg%	mit Bilir. 10 mg%	mit Bilir. 20 mg%
$\bar{x}$ 63,0	63,2	62,5	62,0	61,2
$s_{\bar{x}} \pm 1,9$	$\pm 1,4$	$\pm 1,5$	$\pm 1,4$	$\pm 2,4$
n	4	4	4	4
d	- 0,375	- 0,25	- 0,925	1,35
s_d^2	2,3	2,15	5,879	4,825
t	- 0,326	- 0,232	0,315	0,559
p	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.

Nitrofurantoin wurde durch Bilirubin nicht verdrängt.

4.5 Salicylsäure

Tab. 6

Plasmaproteinbindung für Salicylsäure ohne und mit Zusatz von 20 mg% Bilirubin.

t-Test für gepaarte Werte.

P l a s m a p r o t e i n b i n d u n g

ohne Bilirubin	mit Bilirubin 20 mg%
$\bar{x}$ 96,5	96,6
$s_{\bar{x}} \pm 0,7$	$\pm 0,5$
n	4
d	- 0,025
s_d^2	1,22
t	- 0,041
p	n.s.

Salicylsäure wurde durch Bilirubin nicht verdrängt.

4.6 Desipramin

Tab. 7

Plasmaproteinbindung für Desipramin ohne und mit Zusatz von 20 mg% Bilirubin.

t-Test für gepaarte Werte.

P l a s m a p r o t e i n b i n d u n g

ohne Bilirubin	mit Bilirubin 20 mg%
----------------	----------------------

$\bar{x}$	76,7	79,9
$s_{\bar{x}}$	$\pm 1,6$	$\pm 1,6$
n		4
d		- 0,22
s_d^2		1,47
t		- 4,38
p		$\leq 0,05$

Die Proteinbindung von Desipramin wurde durch Bilirubin-zusatz mit einer Signifikanz von $p \leq 0,05$ vergrößert.

5. Diskussion

Es wurden Substanzen mit hoher Proteinbindung und Substanzen mit mittlerer Proteinbindung ausgewählt.

Alle untersuchten Substanzen besitzen im Neugeborenenplasma eine bis zu doppelt so hohe freie Konzentration im Vergleich zum Erwachsenenplasma. Auch dieser Gesichtspunkt war für die Auswahl entscheidend.

Erstaunlicherweise ergab sich nach Bilirubinzusatz auch bei Meticillin, das nur zu 60% an Plasmaproteine gebunden ist, eine Verdrängung. Andererseits zeigte Salicylsäure mit hoher Proteinbindung keine Verdrängung nach Bilirubinzusatz.

Eine Verdrängung durch Bilirubin ist demnach nicht abhängig von dem Ausmaß der Plasmaproteinbindung.

Kurz et al. (1977) stellten den Vorteil der Gleichgewichtsdialyse gegenüber Methoden wie der Ultrafiltration, Ultrazentrifugation und Gelfiltration heraus.

Bilirubin gelangt nicht aus dem Dialysierschlauch heraus, wie vergleichende Blindproben ergaben.

Die zugesetzte Bilirubinkonzentration betrug bei meinen Versuchen 2 , 4 , 10 und 20 mg%. Dies entspricht Konzentrationen wie sie physiologischerweise vorkommen.

Bei Früh- und Neugeborenen liegen die Werte normalerweise unter 15 mg%. Bei 5% aller Neugeborenen übersteigt die Bilirubinkonzentration 15 mg%.

Krasner et al. (1972) bestimmten an fünfzig Neugeborenen die Bindungskapazität von Bilirubin an Albumin. Sie liegt zwischen 0,9 und 2,2 Mol Bilirubin pro Mol Albumin.

Ein Verhältnis von 1 Mol Bilirubin zu 1 Mol Albumin bedeutet, daß 9 mg Bilirubin von 1 Gramm Albumin gebunden werden.

Der Bilirubinzusatz von 20 mg% entspricht einem Verhältnis von 5 mg Bilirubin zu 1 Gramm Albumin. Die Bindungskapazität für Bilirubin war demnach bei meinen Versuchen nicht abgesättigt.

Die Bindungsverhältnisse von Bilirubin an Albumin wurden insbesondere von Odell (1973) untersucht. Durch in vitro Versuche wies er nach, daß Albumin zwei Zentren der Bilirubinbindung aufweist.

Ein Zentrum hoher Affinität, das bei einem molaren Verhältnis Albumin : Bilirubin von 1:1 abgesättigt ist, und aus welchem Bilirubin nicht zu verdrängen ist.

Weiterhin ein Zentrum niedrigerer Bindungsaffinität, aus welchem Bilirubin durch andere Substanzen verdrängt wird. Die Bindung an das Zentrum hoher Affinität liegt in vivo wesentlich niedriger, da viele Bindungen an Albumin Veränderungen an tertiären Albuminstrukturen hervorrufen (Odell 1969).

Freie Fettsäuren z.B. werden an das Zentrum hoher Affinität gebunden und vermindern die Fähigkeit Bilirubin zu binden. Die Verfügbarkeit des Zentrums hoher Affinität verhält sich umgekehrt zur Konzentration der freien Fettsäuren, d.h. die Anwesenheit freier Fettsäuren ist entscheidend für die Bindungsfähigkeit von Bilirubin an Albumin.

Auch Windorfer (1973) fand eine Verdrängung von Bilirubin.

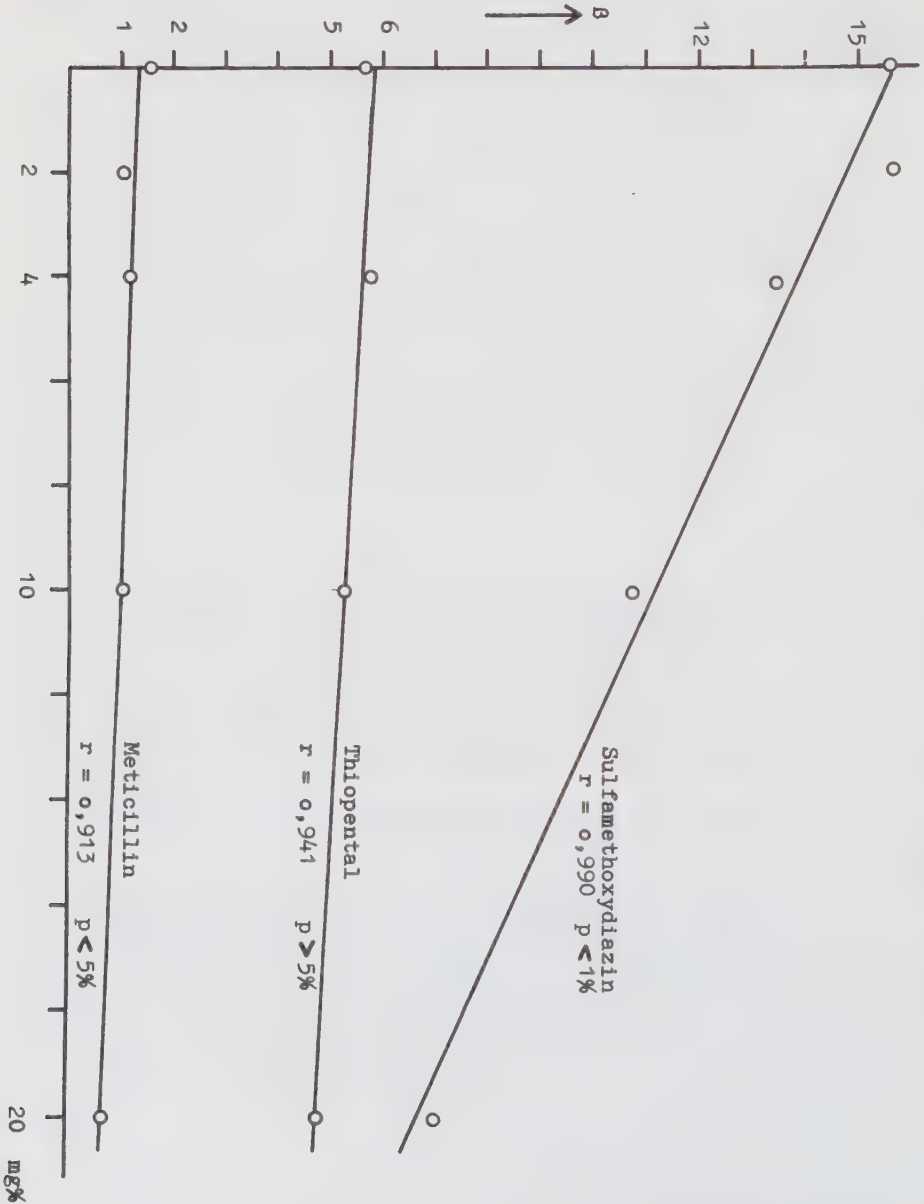
Durch Gabe von Heparin wird bei der Austauschtransfusion mit heparinisiertem Frischblut eine Verdrängung über eine Mobilisierung freier Fettsäuren hervorgerufen. Er wies eine Verdrängung von Bilirubin durch Stoffe wie Diazepam, Novobiocin, Oxacillin, Na-salicylat und Sulfamethoxazol-Trimethoprim nach.

Bei der Behandlung hyperbilirubinämischer Kinder mit diesen Substanzen mahnte er zur Vorsicht.

Die Freisetzung von Bilirubin geschieht entweder durch Konkurrenz um denselben Rezeptor, oder durch sekundäre allosterische Beeinflussung der Bilirubinbindung.

Abb. 4

Quotient aus gebundener zur freien Konzentration (β) in Abhängigkeit von der Bilirubinkonzentration. Regressionsgeraden.



Für Substanzen, bei denen ich eine signifikante Verdrängung durch Bilirubin gefunden habe, trug ich im Koordinatensystem die Bilirubinkonzentrationen (unabhängige Variable x) in Abhängigkeit des Quotienten aus gebundener zur freien Konzentration (abhängige Variable y) auf. Die Werte liegen nahezu auf einer Geraden. Es wurde die Regressionsgerade berechnet und aufgetragen. Das Mittel der quadratischen, vertikalen Abweichungen zwischen der Geraden werden damit so klein wie möglich.

Die Gerade kann durch die allgemeine Gleichung festgelegt werden:

$$y = a + bx \quad \text{wobei: } y = \frac{B}{F}$$
$$x = C_{\text{Bilir.}}$$
$$a = \left(\frac{B}{F}\right)_0$$

$$\text{also: } \frac{B}{F} = \left(\frac{B}{F}\right)_0 - K C_{\text{Bilir.}}$$

Die Höhe der Geraden gibt den durchschnittlichen Wert von $\frac{B}{F}$ für jeden Wert von $C_{\text{Bilir.}}$ an.

K oder b bedeutet Steigung der Geraden oder Regressionskoeffizient. Sie stellt ein Maß der Abhängigkeit des Quotienten $\frac{B}{F}$ von der Bilirubinkonzentration dar.

Die Werte ergeben folgende Regressionsgeraden:

Sulfamethoxydiazin

$$\frac{B}{F} = 15,81 - 0,46 C_{\text{Bilir.}}$$

$$r = 0,99$$

$$p < 1 \%$$

Thiopental

$$\frac{B}{F} = 5,89 - 0,057 C_{\text{Bilir.}}$$

$$r = 0,941$$

$$p > 5 \%$$

Meticillin

$$\frac{B}{F} = 1,34 - 0,033 C_{\text{Bilir.}}$$

$$r = 0,913$$

$$p < 5 \%$$

r = Korrelationskoeffizient; p = Irrtumswahrscheinlichkeit

Bei Sulfamethoxydiazin und bei Meticillin fällt der Quotient aus $\frac{B}{F}$ auf die Hälfte vom Ausgangswert ab.

$\frac{B}{F}$ entspricht ungefähr der Bindungskonstanten.

Sie nimmt mit steigender Bilirubinkonzentration in linearer Funktion ab.

Die Verdrängung durch Bilirubin konnte von einigen Autoren nachgewiesen werden.

Colin Chignell et al. (1971) entfernte im Albumin Neugeborener endogen gebundene Anionen durch Behandeln mit Tierkohle. Er fand eine dem Albumin Erwachsener entsprechende Proteinbindung. Die Zugabe von 20 mg% Bilirubin zur Albuminfraktion verringerte die Proteinbindung für Sulfaphenazol.

Nach Rane et al. (1971) besteht eine positive Korrelation zwischen der freien Konzentration von Phenytoin und der Plasmakonzentration von Bilirubin bei normalen und hyperbilirubinämischen Kindern.

Krasner et al. (1971) konnte experimentell nachweisen, daß es sich dabei nicht um eine kompetitive Verdrängung um die gleichen Bindungsstellen handelt, da Phenytoin die Bilirubinbindung an Albumin nicht beeinflusst. Er hält eine Änderung der Konformation des Albumins bei der Bindung von Bilirubin für möglich, oder aber eine sehr strenge Bindung von Bilirubin an Albumin.

Kurz et al. (1977) untersuchten die Bindungsverhältnisse an isolierten Plasmafraktionen. Auch hier wurde der Einfluß von Bilirubin deutlich an Substanzen, die an Albumin gebunden sind.

Bei der Untersuchung von Kurz et al. (1976) über die unterschiedliche Proteinbindung von Neugeborenen und Erwachsenen lag die durchschnittliche Bilirubinkonzentration bei Neugeborenen zwischen 1,4 und 2,6 mg% Bilirubin; im Erwachsenenplasma zwischen 0,1 und 0,3 mg%.

Bei diesen Bilirubinkonzentrationen ist nach meinen Untersuchungen keine Verdrängung zu erwarten. Die unterschiedlichen Proteinbindungen Neugeborener und Erwachsener können somit nicht auf die verschiedenen Bilirubinkonzentrationen zurückgeführt werden. Andere Faktoren müssen für die Verdrängung verantwortlich sein.

Kurz et al. (1977) diskutierten außer der Verdrängung durch Bilirubin folgende Punkte:

1. Unterschiedliche Bindungseigenschaften von Albumin Neugeborener und Erwachsener. Diese Aussage wurde durch Arbeiten von Miyoshi und Saigo (1966) belegt, die eine Umwandlung des Neugeborenenalbumins im Zeitraum von vier Monaten zu Erwachsenenalbumin postulierten.
2. Unterschiedliche Bindungseigenschaften der Globuline von Neugeborenen und Erwachsenen.
3. Eine Interaktion von Albuminen mit Globulinen bei Neugeborenen. Dieser Mechanismus wurde schon von Garn und Kimbel (1961) vermutet, nach dem Sulfonamide an Globuline gebunden sind, aber die Eiweißbindung des Humanplasmas im Bereich therapeutischer Sulfonamidkonzentrationen nicht höher waren als die einer äquivalenten Humanalbuminlösung.

Die freie Plasmakonzentration von Sulfamethoxydiazin wird durch Zusatz von 20 mg% Bilirubin mehr als verdoppelt. Da die freie Konzentration für die pharmakologische Wirkung entscheidend ist, sollte bei der Behandlung hyperbilirubinämischer Kinder mit Sulfonamiden bei Bilirubinwerten >10 mg% die Dosierungsberechnung darauf abgestimmt werden.

Ansonsten bieten die Ergebnisse keine klinische Relevanz. Sie bestätigen die in der Zwischenzeit von verschiedenen Autoren gefundene Verdrängung durch Bilirubin. Die geringere Proteinbindung Neugeborener kann nicht ausschließlich auf die höheren Bilirubinwerte zurückgeführt werden.

6. Zusammenfassung

1. Der Einfluß von Bilirubin auf die Plasma-Proteinbindung von sechs Pharmaka wurde mit der Methode der Gleichgewichtsdialyse untersucht.
2. Eine Erhöhung der freien Pharmakakonzentration durch Bilirubin wurde bei Sulfamethoxydiazin, Meticillin und Thiopental statistisch gesichert nachgewiesen.
3. Bei Nitrofurantoin, Salicylsäure und Desipramin ergab sich keine Verdrängung.
4. Diskussion der Ergebnisse.
5. Klinische Relevanz bei Sulfamethoxydiazin: Bei der Behandlung hyperbilirubinämischer Kinder mit Sulfamethoxydiazin bei Bilirubinwerten >10 mg% sollte die Erhöhung der freien Sulfonamidkonzentration in die Dosierungsberechnung mit einbezogen werden.
6. Die geringere Proteinbindung Neugeborener kann nicht allein auf die höheren Bilirubinwerte zurückgeführt werden.

7. Literaturverzeichnis

BAUR, G., KURZ, H., and H. TRUNK: Alteration of protein-binding during storage of human plasma preparations. *Anaesthesist* 26, 148-150 (1977)

BEHRMANN, R.E., and F.C. BATTAGLIA: Protein binding of human fetal and maternal plasmas to salicylat. *J.Appl.Physiol.* 22, 125-130 (1967)

BRATTON, A.C., E.K. MARSHALL, jr.: A new coupling component for sulfanilamid determination. *J.Biol.Chem.* 128, 537-550 (1939)

BRODIE, B.B., L.C. MARK, E.M. PAPPER, P.A. LIEF, E. BERNSTEIN, E.A. ROVINSTINE: The fate of thiopental in man and a method for its estimation in biological material. *J.Pharmac.Exp.Ther.* 98, 85-96 (1950)

CHIGNELL, C.F., E.S. VESELL, D.K. STARKWEATHER, and CH.M. BERLIN: The binding of sulfaphenazole to fetal, neonatal, and adult human plasma albumin. *Clin.Pharmacol.Ther.* 12, 897-901 (1971)

DIAMOND, I.: Bilirubinbinding and kernikterus. *Advances Pediat.* 16, 99-119 (1969)

EHRNEBO, M., S. AGURELL, B. JALLING, and L.O. BOREUS: Age differences in drug binding by plasma proteins: studies on human foetuses, neonates and adults. *Eur.J.Clin.Pharmacol.* 3, 189-193 (1971)

GANSCHORN, A., and H. KURZ: Unterschiede zwischen der Proteinbindung Neugeborener und Erwachsener und ihre Bedeutung für die pharmakologische Wirkung. *Arch.Pharm.Exp.Path.* 260, 117-118 (1968)

GARN, F.W., KIMBEL, K.H.: Verbleib und Ausscheidung von Depotsulfonamiden.

Arzneimittelforschung 11, 701-707 (1961)

HARRIS, R.C., LUCEY, J.F., and MAC LEAN,

J.R.Pediatrics 21, 875-884 (1958)

KRASNER, J., GIACOIA, G.P., and YAFFE, S.J.: Drug-protein binding in the newborn infant.

Ann.N.Y.Acad.Sci. 226, 101-114 (1973)

KRASNER, J., L.J. STERN, S.J. YAFFE: Bilirubin binding capacity in human newborn plasma.

Pediat.Res., 6, 405 (1972)

KURZ, H.: Die Permeation von Giften in die Leber.

Nauyn-Schmiedebergs Arch.Exp.Path. 247, 164-179 (1964)

KURZ, H., MAUSER-CANSHORN, A., and STICKEL, H.H.:

Different binding of drugs to plasma proteins of human newborns and adults.

1. Communication (1976)

KURZ, H., TRUNK, H., and WEITZ, B.: Evaluation of methods to determine protein-binding of drugs: Equilibrium dialysis, ultrafiltration, ultracentrifugation, and gelfiltration.

Arzneim.Forsch./Drug.Res. 27(II), Nr. 8 (1977)

MATHER, L.E., G.J. LONG, and J. THOMAS: The binding of bupivacaine to maternal and foetal plasma proteins.

J.Pharm.Pharmacol. 23, 359-365 (1971)

MIRKIN, B.L.: Developmental pharmacology.

Ann.Rev.Pharmacol. 10, 255-272 (1970)

MIYOSHI, K., K. SAIJO: Physical-chemical biology (in Japanese) 12, 217 (1967) referred to in:
SCHULTZE, H.E., and J.F. HEREMANS: Molecular biology of human proteins, Vol.2. Physiology and pathology of human proteins.
Elsevier Publishing Co. Amsterdam-London-New York (1966)

MOWAT, A.P.: Developmental effects on liver D-glucuronolactone dehydrogenase levels and on D-glucaric acid excretion in urine; hormonal effects on D-glucaric acid excretion in urine.

J.Endocr. 42, 585-590 (1968)

ODELL, G.B.: The dissociation of bilirubin from albumin and its clinical implications.

J.Pediat. 55, 268-279 (1959)

ODELL, G.B., S.N. COHEN: The determination of the saturation of serum albumin with bilirubin.

J.Pediat. 74, 214-230 (1969)

ODELL, G.B.: Influence of binding on the toxicity of bilirubin.

Ann.N.Y.Acad.Sci. 226, 225-237 (1973)

PRUITT, A.W., and P.G. DAYTON: A comparison of the binding of drugs to adult and cord plasma.

Eur.J.Clin.Pharmacol. 4, 59-62 (1971)

RANE, A., P.K.M. LUNDE, B. JALLING, S.J. YAFFE, and F. SJÖQVIST: Plasma protein binding of diphenylhydantoin in normal and hyperbilirubinemic infants.

J.Pediat. 78, 877-882 (1971)

SILVERMANN, W.A., ANDERSEN, D.H., BLANC, W.A., and CROZIER, D.N.: A difference in mortality rate and incidence of kernikterus among premature infants allotted to two prophylactic antibacterial regiments. Pediatrics 18, 614-625 (1956)

STERN, A.D.T., and DENTON, R.L.: Kernikterus in small premature infants. Pediatrics 35, 483 (1965)

WEAVER, W.J., R.F. RESCHKE: Spectrophotometric determination of sodium 2,6-dimethoxyphenyl penicillin monohydrate (meticillin) J.Pharm.Sci. 52, 362-364 (1963)

WINDORFER, A.: Konkurrenz zwischen Arzneimittel und Bilirubin am Serumprotein. Medical Tribune vom 16.11.73

YAFFE, S.J.: Some aspects of perinatal pharmacology. Ann.Rev.Med. 17, 213-234 (1966)

Lebenslauf

Als viertes Kind des Sägewerkbesitzers Hubert Kern und seiner Ehefrau Hilde, geb. Kuen wurde ich am 2.4.1944 in Bühlertal (Baden) geboren.

Schulen:

Volksschule in Bühlertal

Gymnasium in Bühl, Abitur 1965

Ausbildung:

Praktikum in der Stadt-Apotheke in Bühl 1965-1967

Pharmazeutische Vorprüfung in Freiburg im März 1967

Pharmaziestudium in Karlsruhe von 1968-1971

Pharmazeutische Prüfung am 15.4.1971

Medizinstudium in München von 1971-1976

Ärztliche Prüfung am 15.6.1976

Medizinalassistentenstellen in München:

Klinikum Großhadern, Prof. Riecker

Medizinische Klinik Innenstadt, Prof. Buchborn

Krankenhaus der Barmherzigen Brüder, Priv.Do. Elsässer

Städtisches Krankenhaus Schwabing, Dr. Schmid

